

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 354 号		学位申請者	竹中 ゆかり
審査委員	主査	橋口 照人	学位	博士 (医学)
	副査	垣花 泰之	副査	古川 龍彦
	副査	金蔵 拓郎	副査	畑中 一仁

主査および副査の5名は、平成28年1月20日、学位申請者 竹中 ゆかり 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) 他の動物モデルによる肺高血圧症における HMGB1 の関連はどうか。

(回答) 低酸素誘発による肺高血圧マウスモデルでも、その発症に HMGB1 が役割を担っているとの報告があることから、モノクロタリン (MCT) 誘発肺高血圧ラットモデル以外でも関連があると考えている。

質問2) BALF と血清で HMGB1 レベルが上昇する時期が異なるのはなぜか。

(回答) BALF での上昇は肺由来のもので、血清の上昇はその後の病態進行による多臓器不全の結果であり時期が異なると考えている。

質問3) BALF の TNF- α が3週後より増加しているのは、肺以外の影響によるものか。

(回答) 今回の研究では TNF- α の産生細胞の検討は行っていないが、同モデルの免疫染色で、MCT 投与3週後の肺組織で有意に TNF- α の発現上昇を認めたとの報告があり、主に肺由来と考えている。しかし、他の臓器に対する解析は無く、肺以外の臓器由来の可能性も否定できないと思われる。

質問4) TNF- α は測定を開始されるより前に上がっていたという可能性はないか。

(回答) 同モデルの肺組織で MCT 投与5日後に TNF- α が mRNA レベルで有意な上昇を認めたとの報告があり、その可能性は否定できない。

質問5) 今回のモデルは肺の血管炎症によるものだが、NSAIDs やステロイドによる効果はどうか。

(回答) 同モデルで aspirin や dexamethasone が肺高血圧症を抑制したとの報告がある。

質問6) HMGB1 を標的にすることは、ステロイドと比較してどのような利点があるか。

(回答) ステロイドは易感染、耐糖能異常、消化管出血などの副作用も多い。HMGB1 という一つの分子を標的にすることで、副作用を抑えた治療薬となる可能性があると考えられる。

質問7) 他の DAMPs の検討はされているか。

(回答) ヒストン、ATP、尿酸などの他の DAMPs に関しては、今後の研究課題と考えている。

質問8) MCT の直接のターゲットとして知られているものがあるのか。

(回答) 肺の内皮細胞を障害することが報告されているが、毒性の明確な機序は分かっていない。

質問9) 腹腔内投与しているのに、肺に最も障害が強く出る理由はなにか。

(回答) MCT は肝に存在する酵素チトクローム p450 により代謝されて MCTP となり血中にはいることで毒性を発揮し、肺障害、肝障害を惹起する。用量依存性であり、肝障害に比べより低量で肺障害を起こすため、今回の投与量では、肺の障害が主となったと考える。

質問10) 蛍光免疫染色で、正常の肺胞マクロファージでは HMGB1 は染色されないのか。例えば、採取した腹腔内マクロファージなどで検討しても、染色されないものであるか。

(回答) 健常者の BALF 中肺胞マクロファージでは、HMGB1 は細胞質でほとんど染色されない。

質問11) 生存曲線をみた研究で、観察期間を過ぎたモデルラットはその後どうなるのか。

(回答) 実験では安楽死させているが、当モデルは肺高血圧の可逆性がありその後も生存の可能性はある。

質問12) RAGE、TLR の下流にある NF- κ B を阻害する薬剤、レセプターを阻害する薬剤の効果はどうか。

(回答) TLR4 ノックアウトマウスは低酸素誘発肺高血圧症に抵抗性を示す。また、ラットで NF- κ B 阻害剤が肺高血圧を改善するとの報告もあり、HMGB1 が TLR4 にリガンドとして作用し、NF- κ B を誘導している可能性を考えている。

質問 1 3) MCT が多臓器障害を起こすのであれば、BALF 中の HMGB1 は肺由来と言ってよいのか。

(回答) 供給源となりうる肝については、HE 染色で 4 週まで著明な変化を認めない。また、同時に測定した血清では HMGB1 の上昇を認めないことから、肺由来ではないかと考えている。

質問 1 4) MCT の他の臓器に対する影響はどうか。

(回答) 動物モデルで、急性肺障害、間質性肺障害、肺壊死性血管炎、心筋炎、肝障害の報告がある。

質問 1 5) BALF 中 MCP-1、TNF- α の経時的変化を評価するグラフでコントロール群が必要ではないか。

(回答) 必要と考えているが、今回は測定していなかった。

質問 1 6) 免疫染色の発色を AEC で行っている。AEC ではもっと赤く染まるのではないか。

(回答) 今回は発色基質にジアミノベンジジンを使用しており、AEC は使用していない。

質問 1 7) 本文で肺高血圧ラットは 5 週目ですべて死亡したとあり、図の生存曲線と誤差があるのでは。

(回答) 本文の肺高血圧ラットとは MCT のみ投与したラットであり、図の生存曲線はコントロール IgY または抗 HMGB1 中和抗体投与群の比較であり異なるグループの実験結果である。

質問 1 8) HMGB1 が作用する細胞や受容体はなにか。可能性として推測される細胞には何があるか。

(回答) 受容体として RAGE、TLR2、TLR4 があり、この受容体の mRNA を解析したが今回の実験では有意差は得られておらず、さらなる検討が必要である。推測される細胞としては、HMGB1 は平滑筋細胞を増殖する作用があり、MCT ラットにみられる肺動脈筋性化に影響を及ぼし得ることから、平滑筋細胞が挙げられると考える。

質問 1 9) マスト細胞は作用しているか。

(回答) 低酸素誘発肺高血圧ラットモデルで、マスト細胞は IL-4 を放出し、自己反応性 B 細胞を刺激することで抗内皮細胞抗体の産生を促すと考えられている。また、脱顆粒により、血管のリモデリング形成の初期に重要な因子であるマトリックスメタロプロテアーゼ活性を調節すると報告されている。

質問 2 0) 血管周囲へ浸潤を認めた炎症細胞とは実際にどのような種類の細胞か。

(回答) 同ラットモデルやヒト肺高血圧症患者の肺病理組織の解析で、血管周囲に浸潤する炎症細胞にはマクロファージ、樹状細胞、T リンパ球、B リンパ球、マスト細胞が含まれていたとの報告がある。

質問 2 1) 病理所見では中膜の所見が主であり、内膜の所見を認めないが何も起こらないのか。

(回答) このモデルでは、ヒト肺高血圧症に特徴的な新生内膜や plexiform lesion を認めない。

質問 2 2) 今回の実験で、抗 HMGB1 中和抗体投与により有意差が示されたサイトカインは、endothelin-1 のみであり、その機序が主となるのか。

(回答) endothelin-1 は有意差があり、少なくとも endothelin-1 を介した機序は関与すると考えられる。他のサイトカインも低下傾向を認め、実験動物の n 数を増やすと有意差がでる可能性があるかも知れない。

質問 2 3) 実臨床に応用するにはどのタイミング、用量が良いと考えるか。

(回答) 動物実験の結果からはストレスが加わった時点でなるべく早期からの投与が望ましいと考える。また、用量に関しては、毒性実験により検討が必要である。臨床応用が可能となれば、臨床試験で患者の HMGB1 値と病態の推移を評価し、適切な時期を検討する必要があると考える。

質問 2 4) BALF 中の IL-1 β に有意な上昇は認めなかったが、proIL-1 β に関しては測定しているか。

(回答) 今回、測定していない。proIL-1 β は、NF- κ B の誘導により産生され、活性化したカスパーゼ 1 に切断され IL-1 β となり、細胞外へ放出される。NF- κ B 以降の経路の解明のためにも今後の課題と考える。

質問 2 5) 肺高血圧症とインフラマゾームが関連するという報告はあるか。

(回答) 検索した範囲で報告は認めなかった。

質問 2 6) ラットを用いているが、マウスでは肺高血圧モデルは MCT で作成できなかったのか。

(回答) MCT は肝で MCTP に代謝され肺高血圧を起こすが、マウスでは代謝酵素が異なり起こさないと報告がある。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。